



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
26.09.2001 Patentblatt 2001/39

(51) Int Cl.⁷: **A61L 24/10**, A61K 38/48,
A61K 47/26, A61K 47/18,
A61K 47/02, A61K 47/00

(21) Anmeldenummer: **01103992.2**

(22) Anmeldetag: **20.02.2001**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(71) Anmelder: **Aventis Behring GmbH**
35002 Marburg (DE)

(72) Erfinder:
• **Metzner, Hubert, Dr.**
35041 Marburg (DE)
• **Schneider, Heinrich**
35094 Lahntal (DE)

(30) Priorität: **18.03.2000 DE 10012732**

(54) **Thrombin-Zubereitungen und Verfahren zu ihrer Herstellung**

(57) Die Herstellung einer Thrombin-Zubereitung wird beschrieben, die aus Prothrombin gewonnen wird, das nach Aktivierung zu Thrombin ohne Zugabe von Thromboplastin durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt wird, wobei anschliessend noch Viren inaktiviert oder entfernt werden können. Vor

oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie kann zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt werden. Es wird ausserdem eine Thrombin-Zubereitung beschrieben, die als Stabilisator einen nicht-kovalent bindenden Inhibitor enthält und der zur Stabilisierung im flüssigen Zustand weitere Stabilisatoren zugesetzt werden können.

Beschreibung

[0001] Der Gegenstand der Erfindung ist eine im flüssigen Zustand stabile Thrombin-Zubereitung, die sich durch eine hohe Reinheit und Virussicherheit auszeichnet, sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

[0002] Seitdem es gelungen ist, Thrombin kommerziell herzustellen, haben sich hierfür mehrere Anwendungen ergeben. Als Hauptanwendungen sind derzeit neben diagnostischen Zwecken der Einsatz als lokales Hämostyptikum oder als Komponente eines Gewebeklebers zusammen mit einer Fibrinogen-haltigen Komponente zu nennen. Voraussetzung für den Einsatz von Thrombin für medizinische Zwecke ist, dass es dem Arzt als stabiles Präparat zur Verfügung gestellt werden kann, welches eine hohe Virussicherheit aufweist und möglichst keine unwirksamen Neben- oder Abbauprodukte des Thrombins bzw. anderer Faktoren enthält.

[0003] Zahlreiche Methoden zur Stabilisierung von Thrombin sind bereits vorgeschlagen worden. So ist aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 56-39782 ein Verfahren bekannt, bei dem organische Mono- oder Polycarbonsäuren und/oder Mono- oder Polyhydroxycarbonsäuren zur Herstellung von stabilen wässrigen Lösungen von Thrombin eingesetzt werden. Aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 57-18985 ist Albumin als Stabilisator für Thrombin und aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 62-106028 eine Pufferlösung als Stabilisator bekannt. In der europäischen Patentanmeldung 0 302 754 werden ein Zucker und eine Aminosäure, bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 10 Gew.%, als Stabilisatoren für Thrombin-Lösungen vorgeschlagen.

[0004] Des weiteren ist aus der deutschen Offenlegungsschrift 31 22 926 eine lagerfähige Thrombin-Zubereitung bekannt, die neben Natriumchlorid mehrwertige Alkohole mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, schwefelfreie Aminosäuren und Polyethylenglykol zur Herstellung von Thrombinlösungen beschreibt. Schließlich ist auch in der europäischen Patentanmeldung 0 221 700 eine bei einem pH-Wert von 5 bis 8 gepufferte Thrombin-Zubereitung beschrieben, die ggfs. Natriumchlorid und eine Polyhydroxyverbindung enthalten kann.

[0005] Gepufferte und stabilisierte Thrombinlösungen sind auch aus einer Veröffentlichung von J. Chabbat et al. bekannt [J. Chabbat, M. Tellier, P. Porte und M. Steinbuch: Properties of a new fibrin glue stable in liquid state. Thromb. Res. 76: 525-533 (1994)].

[0006] Darüberhinaus ist auch schon in einer Publikation von D.V. Brezniak, H.I. Hassouna und J.W Fenton II [Blood Coagulation and Fibrinolysis, 6, 847-848 (1994)] der Einfluss von Salzen auf die Stabilität von verdünnten α -Thrombin-Lösungen beschrieben worden. Hier wurde gezeigt, dass in verdünnten Thrombin-Lösungen Natriumchlorid-Konzentrationen ab 0,3 Mol/l eine deutliche Stabilisierung bewirken. Danach soll Thrombin in Natriumchlorid-haltigen Lösungen für etwa 2 Wochen bei 37°C stabil sein und somit eine höhere Stabilität als in Calciumchlorid-haltigen Lösungen aufweisen, was möglicherweise durch eine bessere thermische Stabilität gegenüber einer Denaturierung erklärt werden kann.

[0007] In zahlreichen Patentanmeldungen sind auch bereits Verfahren zur Herstellung hochgereinigter Thrombin-Zubereitungen beschrieben worden. So ist aus der europäischen Patentanmeldung 0 439 156 ein Verfahren für die Herstellung eines gereinigten Thrombins mit einer spezifischen Aktivität größer als 1600 U/mg bekannt, das für die Hämostase eingesetzt werden kann. Dabei wird Thromboplastin zur Aktivierung von Prothrombin verwendet und eine Anionenaustausch- und eine Kationenaustauschchromatographie mit Trägermaterialien basierend auf Agarose eingesetzt. Ein "ultra-reines", klares, farbloses Rinder-Thrombin mit einer spezifischen Aktivität von ca. 8.000 bis 11.000 NIH U/mg wird in der US-Patentschrift 5 397 704 beschrieben. Zur Prothrombin-Aktivierung wird dort Thromboplastin aus Rinderlunge eingesetzt und zur Proteinreinigung werden Anionenaustausch- und Kationenaustauschchromatographie verwendet.

[0008] Keines der bisher bekannten Verfahren erlaubt jedoch die Herstellung einer gereinigten, Calcium-Ionen enthaltenden, virussicheren und im flüssigen Zustand bei 0°C und höheren Temperaturen stabilen Thrombin-Zubereitung, deren Thrombinaktivität nach 12 Monaten und darüber hinaus noch bei über 70-80 % des Ausgangswertes liegt. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung einer derartigen Thrombin-Zubereitung zu entwickeln, wobei aus Gründen der Präparatesicherheit auf die Verwendung von Thromboplastin bei der Prothrombin-Aktivierung verzichtet werden sollte. Außerdem bestand die Aufgabe, hohe Konzentrationen von Polyolen als Stabilisatorzusatz zu vermeiden, weil dadurch eine unerwünschte Erhöhung der Viskosität der Zubereitung eintritt.

[0009] Es wurde nun gefunden, dass diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung gelöst wird, bei dem ein aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnenes Prothrombin nach Aktivierung zu Thrombin ohne Zusatz von Thromboplastin sowie gegebenenfalls weiteren Aufarbeitungsschritten durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt wird und gegebenenfalls anschließend die Viren inaktiviert oder entfernt werden.

[0010] Eine weitere Verbesserung dieses Verfahrens ist möglich, wenn vor oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird. Dabei können die Chromatographien als "positive" (Bindung des Thrombins) oder als "negative" Chromatographie (Bindung der Verunreinigungen) durchgeführt werden.

[0011] Da für die Erzielung einer hohen Thrombin-Stabilität im flüssigem Zustand eine ausreichende Reinheit der eingesetzten Thrombin-Lösung notwendig ist, wurde nach einem einfachen und verbesserten Verfahren gesucht, um

hochreines Thrombin mit hoher Virussicherheit herzustellen. Ausgegangen werden kann dabei z.B. von dem in der europäischen Patentanmeldung 0 543 178 beschriebenen Verfahren zur Herstellung eines Thrombinkonzentrats. Aber auch andere Verfahren, bei denen teilgereinigtes Prothrombin in Anwesenheit von Calciumsalzen zu Thrombin aktiviert wird, können erfindungsgemäss als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Thrombin-Zubereitung eingesetzt werden.

[0012] Setzt man nun zur Thrombin-Reinigung die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) allein oder in Kombination mit einer Kationenaustauschchromatographie (CEC) ein, dann wird dadurch eine effektive und einfache Reinigung erreicht. Die Reihenfolge dieser beiden chromatographischen Verfahren ist dabei beliebig. Wird die Chromatographie zunächst mit einem hydrophoben Träger durchgeführt, kann das Thrombineluat anschließend direkt an den Kationenaustauscher gebunden und dort mittels eines Salzgradienten eluiert werden. Durch Kombination dieser beiden Trennprinzipien wird bei einer guten Ausbeute von etwa 70% über beide Reinigungsschritte eine Thrombin-Zubereitung hoher Reinheit erhalten.

[0013] Gleichzeitig wird dabei auch eine gute Abtrennung von Nebenprodukten wie aktivierten oder nicht-aktivierten Gerinnungsfaktoren und von im Gerinnungstest wenig oder nicht aktiven Thrombin-Formen (z.B. Prothrombin, β -Thrombin, γ -Thrombin oder anderen Thrombin- oder Prothrombinfragmenten) erreicht. Die Kombination der beiden genannten chromatographischen Verfahren ergibt eine höhere Reinheit als die alleinige Verwendung einer Ionenaustauschchromatographie.

[0014] Das erfindungsgemässe Herstellungsverfahren wird so durchgeführt, dass zunächst Thrombin geringer oder mittlerer Reinheit hergestellt wird. Dies kann so erfolgen, dass die Adsorption von Prothrombin aus Plasma oder einer Plasmafraktion an einem Ionenaustauscher erfolgt. Das dadurch gewonnene Prothrombin kann dann einer Virusinaktivierung, z.B. mittels Pasteurisierung oder einer anderen bekannten Methode, und gegebenenfalls weiteren Aufarbeitungsschritten unterworfen und dann das Thrombin ohne Zusatz von aus tierischem Gewebe gewonnenen Thromboplastin nach an sich bekannten Verfahren aktiviert werden. Mit der sich dann anschließenden hydrophoben Interaktionschromatographie wird eine Abreicherung von begleitenden Plasmaproteinen, aktivierten Faktoren oder ihren Fragmenten sowie von Thrombin-Spaltprodukten erreicht. Dieser Reinigungseffekt wird durch die nachgeschaltete Kationenaustauschchromatographie weiter verstärkt.

Nach Elution des reinen Thrombins wird dann durch Zugabe geeigneter Puffersubstanzen der pH-Wert der Zubereitung auf den Bereich von 5 bis 8 eingestellt und Stabilisatoren zugesetzt. Der Zusatz von Puffersubstanz(en) und Stabilisatoren kann auch gemeinsam erfolgen.

[0015] Bei der als chromatographische Methode an sich bekannten hydrophoben Interaktionschromatographie wird als Adsorbens ein Gel mit gekoppelten, hydrophoben Resten eingesetzt. Besonders geeignete hydrophobe Reste sind hier Phenylreste oder andere Liganden mit einer ähnlichen Hydrophobizität.

[0016] Als Kationenaustauscher wird vorzugsweise ein Gel mit hoher Auflösung für die verschiedenen Thrombin-Varianten eingesetzt. Beispiele für geeignete Kationenaustauschergel sind Fractogel EMD SO_3 (Merck, Darmstadt), Macro Prep 50S (Biorad, München) oder andere Kationenaustauscher, die den heutigen Anforderungen bezüglich Reinigung und Sterilisierbarkeit entsprechen.

[0017] Die nach chromatographischer Reinigung gewonnene Thrombin-Lösung kann dann unmittelbar einer Virusinaktivierung oder einer Virusabreicherung wie z. B. einer Filtration über kleinporige Membranen zugeführt werden, wodurch eine effektive Abtrennung auch kleinster Viren unter Erzielung einer hohen Thrombinausbeute möglich ist. Eine Virusinaktivierung oder -abreicherung von Thrombin kann jedoch auch vor der chromatographischen Reinigung erfolgen, falls dadurch der Gesamtprozess erleichtert wird (z.B. durch Entfernung unerwünschter Komponenten oder Nebenprodukten in der nachfolgenden Chromatographie).

[0018] Zur Formulierung der Thrombin-Zubereitung als einer im flüssigen und gegebenenfalls auch im eingefrorenen Zustand stabilen und lagerfähigen Komponente für den Einsatz in einem Gewebekleber oder alleine als lokales Hämostyptikum sollte mit Hilfe eines Puffers ein pH-Wert von etwa 5,0 bis 8,0 eingestellt werden. Zur Erzielung des gewünschten Effektes bei der Anwendung bzw. zur Stabilisierung werden dann der Zubereitung ein lösliches Calciumsalz, Natriumchlorid, ein Zucker oder ein Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure oder auch das Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure und/oder das Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure zugesetzt. Damit ergeben sich gute Stabilitäten im flüssigen und/oder gefrorenen Zustand für 12 Monate Lagerzeit und darüber hinaus.

[0019] Es hat sich auch gezeigt, dass durch Zusatz von die Thrombin-Aktivität in vitro nicht-kovalent inhibierenden Substanzen die Stabilität vor allem bei Raumtemperatur noch weiter signifikant erhöht werden kann, indem die Autolyse des Thrombins zurückgedrängt wird. Geeignete Substanzen hierfür sind Verbindungen wie Benzamidin oder p-Aminobenzamidin oder andere niedrig- bis mittelaaffine Protease-Inhibitoren. Durch Zusatz dieser niedrig- oder mittelaaffinen Inhibitoren wird die Aktivität von Thrombin gegenüber Substanzen wie Fibrinogen nicht wesentlich beeinträchtigt und dadurch auch nicht z.B. der spätere Einsatz als Komponente eines Gewebeklebers.

[0020] Mit den erfindungsgemässen Verfahren werden Thrombin-Zubereitungen herstellbar, die in flüssigem und/oder gefrorenen Zustand über Monate oder Jahre gelagert werden können und deren Aktivität in dieser Zeit nicht unter 70-80% abfällt.

[0021] Mit den erfindungsgemässen Verfahren ist es möglich, auch in Anwesenheit von Calciumsalzen, die die ther-

mische Stabilität von Thrombin erniedrigen [B.H. Landis, K.A. Koehler und J.W. Fenton II: Human Thrombins. J Biol chem 256: 4604-4610 (1981)], Thrombin-Zubereitungen herzustellen, die bis zu 24 Monaten und darüber hinaus bei 4°C eine hohe Stabilität ergeben, wie im Gerinnungstest nachweisbar ist. Auch im gefrorenen Zustand sind viele der in Tabelle 4 gezeigten Thrombin-Zubereitungen stabil und selbst bei Raumtemperatur ist die Stabilität in den meisten Fällen für einen Zeitraum von 3 bis 6 Monaten gegeben. Bei Raumtemperatur lässt sich die Stabilität im Besonderen durch den Zusatz niedrig- oder mittelafliner Thrombin-Inhibitoren wie z.B. Benzamidin, p-Aminobenzamidin oder anderer Protease- bzw. Thrombin-Inhibitoren erhöhen, ohne dass dabei die Aktivität gegenüber Fibrinogen im Gerinnungstest signifikant abfällt.

[0022] Die nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Thrombin-Zubereitungen können u.a. als Komponenten eines im flüssigen oder eingefrorenen Zustand lagerfähigen Fibrinklebers, bestehend aus zwei Komponenten, z.B. einer Thrombin- und einer Fibrinogen-haltigen Komponente, oder bestehend aus drei Komponenten, z.B. einer Thrombin-, Fibrinogen- und einer Faktor XIII-haltigen Komponente, eingesetzt werden, wie u.a. in der deutschen Patentanmeldung 198 53 033.1 beschrieben. Dabei kann die so hergestellte Thrombin-Zubereitung entweder in situ mit den anderen Komponenten vermischt werden oder sie kann im Falle eines 3-Komponenten Fibrinklebers auch vorab mit einer der Komponenten vermischt werden, bevor beide der dritten Komponente zugegeben werden. Möglich ist aber auch die Herstellung von lyophilisierten Thrombin-Zubereitungen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens für therapeutische Zwecke, wobei nach Rekonstitution im flüssigen Zustand noch eine entsprechend hohe Stabilität beobachtet wird.

[0023] Schließlich können die erfindungsgemäß hergestellten Thrombin-Konzentrate auch allein oder in Kombination mit Trägermaterialien als Wirkstoff zur lokalen Blutstillung eingesetzt werden.

[0024] Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1: Thrombinreinigung

[0025] Ausgehend von einem Thrombin-Konzentrat geringer oder mittlerer Reinheit, hergestellt nach bekannten Verfahren, wurden zwei Chromatographieschritte durchgeführt.

[0026] Zunächst wurde die Thrombinlösung mit 0,6 Mol/l Natriumsulfat versetzt und an einem hydrophoben Chromatographiegel (hier: Phenyl-Sepharose HP, Hersteller: Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) adsorbiert, das zuvor mit Puffer A (10 mMol/l Na-Phosphat pH 6,5) enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat äquilibriert worden war. Nach Waschen mit Puffer A enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat wurde durch einen Gradienten mit abfallendem Natriumsulfat-Gehalt in Puffer A das gebundene Thrombin eluiert. Verunreinigungen und Thrombinfragmente wurden zu einem großen Teil im Durchlauf oder in den Waschfraktionen abgetrennt.

[0027] Die Thrombin-Fraktion wurde ohne weitere Behandlung direkt auf eine mit Puffer A äquilibrierte Kationentauschersäule (hier: Fractogel® EMD SO₃, Hersteller: Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben, mit Äquilierungspuffer A gewaschen und durch einen Gradienten von 0 bis 1,0 Mol/l Natriumchlorid in Puffer A eluiert. Im Verlaufe der Trennung werden letzte Nebenprodukte und Thrombin-Fragmente abgetrennt, so dass das erhaltene α -Thrombin-Eluat eine hohe spezifische Reinheit von ca. 3500 IU/mg aufwies [Proteinbestimmung mittels Bestimmung der Absorption bei 280 nm und Umrechnung mit dem Faktor von 1,74 für eine 0,1%ige Lösung nach J.W. Fenton, II, M.J. Fasco, A. B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young, and J.S. Finlayson. Human Thrombins. J Biol Chem 252: 3587-3598 (1977)]. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Thrombin-Reinigung und die erhaltene spezifische Aktivität.

[0028] Auf dieser Stufe kann das Thrombin in gekühltem oder tiefgeköhltem Zustand bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Tabelle 1:

Probe	Absorption 280 nm	Protein* (mg/ml)	Aktivität (IU/ml)	Spezifische Aktivität (IU/mg)
Thrombin, Ausgangsmat	13,78	7,92	6418	810
HIC-Eluat	1,085	0,624	1372	2199
CEC-Eluat	6,65	3,822	13370	3498

* A_{280,0,1%} = 1,74

Beispiel 2: Thrombinreinigung

[0029] Ausgehend von einem Thrombin-Konzentrat mittlerer oder geringer Reinheit wurden zwei Chromatographieschritte durchgeführt. Zunächst wurde die Thrombin-Lösung mit 0,6 Mol/l Natriumsulfat versetzt und an einem hydro-

EP 1 136 084 A1

phoben Chromatographiegel (hier: Phenyl-Sepharose HP, Hersteller: Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) adsorbiert, das zuvor mit Puffer B (10 mMol/l Na-Phosphat, 0,1% PEG pH 6,5 [hier PEG 6000, aber auch andere Molekulargewichtsbereiche sind einsetzbar]) enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat äquilibriert worden war. Nach Waschen mit Puffer B enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat wurde durch einen Gradienten mit abfallendem Natriumsulfat-Gehalt in Puffer B das gebundene Thrombin eluiert. Verunreinigungen und Thrombinfragmente wurden zu einem großen Teil im Durchlauf oder in den Waschfraktionen abgetrennt.

[0030] Die Thrombin-Fraktion wurde ohne weitere Behandlung direkt auf eine mit Puffer C (10 mMol/l Na-Phosphat, 166 mMol/l L-Arginin pH 6,5) äquilibrierte Kationentauschersäule (hier: Fractogel® EMD SO₃, Hersteller: Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben, mit Äquilibrierungspuffer C gewaschen und durch einen Gradienten von 0 bis 1,0 Mol/l Natriumchlorid in Puffer C eluiert. Im Verlaufe der Trennung werden noch vorhandene Nebenprodukte und Thrombin-Fragmente abgetrennt, so dass das erhaltene α -Thrombin-Eluat eine hohe spezifische Reinheit von ca. 3300 IU/mg aufwies (vgl. Tabelle 2).

[0031] Auf dieser Stufe kann das erhaltene Thrombin in gekühltem oder tiefgekühltem Zustand bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Tabelle 2:

Probe	Absorption 280 nm	Protein* (mg/ml)	Aktivität (IU/ml)	Spezifische Aktivität (IU/mg)
Thrombin, Ausgangsmat	12,49	7,178	5895	821
HIC-Eluat	2,042	1,174	2696	2296
CEC-Eluat	8,03	4,615	15150	3283

*A_{280,0,1%} = 1,74

Beispiel 3: Thrombinreinigung

[0032] Entsprechend Beispiel 1 wurde eine Thrombinreinigung durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, dass der bei der Chromatographie eingesetzte Puffer anstelle von Natriumphosphat 20 mMol/l L-Histidin enthält. Diese Modifikation ergibt vergleichbare Reinigungsergebnisse wie in Beispiel 1, kann aber die weitere Aufarbeitung zum Endprodukt vereinfachen, wenn hier z.B. Histidin als Puffersubstanz enthalten sein soll.

Beispiel 4: Thrombinreinigung und Filtration

[0033] Ausgehend von einem wie in den Beispielen 1 bis 3 gereinigten Thrombin-Eluat wurde nach hydrophober Interaktionschromatographie und Kationenaustauschchromatographie eine Filtration an einer Membran mit kleiner Porengröße durchgeführt (z.B. Planova™ 15 nm). Mit Hilfe dieser Membran lassen sich selbst kleine Viren wie Parvoviren effektiv abtrennen. Es wurde gefunden, dass bei Verwendung des gereinigten Thrombins als Ausgangsmaterial bei einer guten Filtrationsrate sehr gute Ausbeuten bezüglich Thrombinaktivität und Protein erhalten wurden (siehe Tabelle 3). Dadurch ist dieses Verfahren geeignet zur Herstellung eines Thrombin-Konzentrates mit hohen Abreicherungsfaktoren für Viren.

Tabelle 3:

Filtration von 123 ml gereinigtem Thrombin über ein Planova™ 15 nm Modul (0,001 m ²)		
Probe	Thrombin-Aktivität, gesamt	Protein, gesamt*
vor Filtration	800.240 IU	245,3 mg
nach Filtration	797.960 IU	239,0 mg
Ausbeute	99,7%	97,4%

* A_{280,0,1%} = 1,74

Beispiel 5: Thrombin-Formulierungen

[0034] Ausgehend von chromatographisch gereinigtem Thrombin wurden verschiedene Formulierungen hergestellt und bei Temperaturen von -20°C, 4°C, 20-25°C und teilweise auch bei 37°C gelagert. Die Herstellung dieser Throm-

binlösungen erfolgte durch Diafiltration der gereinigten Thrombinkonzentrate gegen den Formulierungspuffer oder durch Diafiltration gegen einen Grundpuffer und Zusatz der restlichen Additive, pH-Einstellung und Einstellung der Thrombin-Konzentration. Thrombin-Konzentrationen von ca. 1 bis zu ca. 15.000 IU/ml können auf diese Weise hergestellt werden.

[0035] Durch Bestimmung der Thrombinaktivität in einem Gerinnungstest mit Fibrinogen als Substrat wurden die Formulierungen auf ihre Stabilität getestet. Tabelle 4 zeigt eine Auswahl der erfindungsgemäßen Formulierungen und ihre Stabilisatorzusammensetzung und Tabelle 5 zeigt die entsprechenden Stabilitätsdaten bei bis zu drei Temperaturen.

Tabelle 4:

Zusammensetzung von Thrombinformulierungen	
1.	360 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
2.	360 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
3.	150 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
4.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 100 mMol/l Na-Succinat, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
5.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 100 mMol/l Na-Succinat, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
6.	150 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 100 mMol/l Na-Succinat, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
7.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 50 mMol/l Na-Laktat, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
8.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 2% (w/v) Mannitol, 10 mMol/l p-Aminobenzamidin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
9.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 2% (w/v) Mannitol, 10 mMol/l Benzamidin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
10.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 4% (w/v) HSA, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
11.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 1% (w/v) Mannitol, 142 mMol/l L-Arginin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
12.	90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl ₂ , 100 mMol/l Na-Succinat, 0,1% Polyvinylpyrrolidon (K15), 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0.

Tabelle 5: Stabilität von Thrombin in verschiedenen Formulierungen bei 4°C, -20°C und 20-25°C

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: 4°C

Lagerzeit (Monate)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101.5	95.8	98.9	94.0	100.4	100.8	110.6	102	98.0	106.8	108.3	98.0
3	98.9	109.8	103.4	103.1	108.8	104.5	101.6	95.6	91.5	98.5	102.3	103.9
6	100.5	117.5	88.4	97.3	99.0	98.2	108.1	97.6	95.2	103.0	99.4	101.9
9	97.5	112.9	95.6	94.2	91.9	91.6	122.7	102.2	99.6	102.2	91.5	108.0
12	100.2	116.5	93.6	92.4	105.8	106.4	117.2	100.2	97.8	101.2	93.5	103.8
18	89.7	101.7	-	94.7			112.7	-	-	89.2	95.8	104.1
24	100.5		86.8	95.5				100	94.3	89.2	96.2	

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: -20°C

Lagerzeit (Monate)	Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100	100		100	100	100	100			100	100	100	
1	103.6			100.4	88.6	94.3	94.9			47,1	111.0	106.5	
3	97.5			92.6	104.2	93.0	93.9			91,5	103.0	101.3	
6	99.5			92.7	101.3	99.7	98.2			68,6	107.3	96.4	
9	100.3			81.3	92.9	89.2	87.6			92,1	108.0	95.3	
12	94.3			100.5	95.3	104.4	98.5			79,2	104.0	95.1	
18	94.3			-	92.7					-	99.3	99.8	
24	99.0			90.7	100.7					97,2	104.2	100.2	

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: 20-25°C

Lagerzeit (Monate)	Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	105.6	92.4	90.9	91.8	92.6	94.3	95.5	101.7	95.4	99.8	107.3	99.4	81.1
3	92.3	88.2	86.9	88.4	80.0	77.9	75.8	95.4	95.4	96.3	84.2	98.9	77.0
6	85.6	66.3	66.8	80.4	71.4	68.6	75.3	92.8	92.8	89.0	69.4	84.8	60.6
9	72.1	58.3	58.8	75.9	51.8	50.7	59.1	96.1	96.1	91.9	48.8	74.4	53.3
12	64.2	50.1	51.5	65.3	43.7	43.9	42.8	100.9	100.9	90.6	42.9	64.7	46.6
18								-	-	-			
24								90.1	90.1	82.4			

Patentansprüche

1. Thrombin-Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie als Stabilisator einen nicht-kovalent bindenden Inhibitor enthält.
2. Im flüssigen Zustand stabile Thrombin-Zubereitung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie neben einem löslichen Calciumsalz und Natriumchlorid als Stabilisatoren

- eine Puffersubstanz,
- einen Zucker oder Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure und/oder
- ein Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure oder
- ein Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure

enthält.

3. Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnenes Prothrombin nach Aktivierung zu Thrombin sowie gegebenenfalls weiteren Auf-

4. Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** das für die Aktivierung zu Thrombin eingesetzte Prothrombin im Rahmen seiner Herstellung einer Virusinaktivierung oder Abreicherung unterworfen wird.

5. Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung nach den Ansprüchen 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Thrombin vor oder nach der chromatographischen Reinigung noch einer zusätzlichen Inaktivierung oder Abreicherung von Viren unterworfen wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** vor oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Thrombin-Zubereitung auf einen pH-Wert von 5,0 bis 8,0 eingestellt wird.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Thrombin-Zubereitung neben einem löslichen Calciumsalz und Natriumchlorid als Stabilisatoren

- eine Puffersubstanz,
- ein Zucker oder Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure und/oder
- ein Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure oder
- ein Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure

zugesetzt werden.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Stabilisator eine die Thrombinaktivität inhibierende Substanz zugesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** als eine die Thrombinaktivität inhibierende Substanz Benzamidin oder p-Aminobenzamidin zugesetzt wird.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Adsorbens für die hydrophobe Interaktionschromatographie ein Gel mit gekoppelten hydrophoben Resten eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die hydrophoben Reste des als Adsorbens eingesetzten Gels Phenylreste oder Liganden ähnlicher Hydrophobizität sind.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Thrombin-Zubereitung zur Entfernung von Viren durch eine Membran mit geeigneter Porengröße filtriert wird.

14. Thrombin-Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie nach dem Verfahren der Ansprüche 3 bis 13 erhältlich ist.

15. Verwendung der Thrombin-Zubereitung von Anspruch 1, 2 oder 14 als Hämostypticum, Bestandteil eines Hämostypticums oder als Bestandteil eines Gewebeklebers.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 01 10 3992

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 0 439 156 A (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31. Juli 1991 (1991-07-31) * Seite 2, Zeile 1 - Seite 4, Zeile 57; Ansprüche 1-10; Abbildungen 1,2; Tabelle 1 *	1-9, 11-15	A61L24/10 A61K38/48 A61K47/26 A61K47/18 A61K47/02 A61K47/00
X	EP 0 543 178 A (BEHRINGWERKE AG) 26. Mai 1993 (1993-05-26) * Seite 2, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 3; Ansprüche 1-10; Beispiele 1-6; Tabellen 1,2 *	1-9, 11-15	
X	EP 0 444 692 A (MOCHIDA PHARM CO LTD) 4. September 1991 (1991-09-04) * Seite 2, Zeile 49 - Seite 5, Zeile 57; Ansprüche 1,2,5-11; Beispiele 1,2 *	1-9, 11-15	
X	US 5 219 328 A (MORSE BRENDA S ET AL) 15. Juni 1993 (1993-06-15) * Spalte 2, Zeile 19 - Spalte 5, Zeile 25; Ansprüche 1-6; Beispiel 1 *	1-9, 11-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			A61K
<p>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</p> <p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
MÜNCHEN		20. Juli 2001	
		Prüfer	
		Kling, I	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A : technologischer Hintergrund</p> <p>O : nichtschriftliche Offenbarung</p> <p>P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03 82 (P/MC/09)

Europäisches
PatentamtUNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT CNummer der Anmeldung
EP 01 10 3992Vollständig recherchierte Ansprüche:
10Unvollständig recherchierte Ansprüche:
1-9, 11-15

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Die geltenden Patentansprüche 1 -9, 11-15 beziehen sich auf ein Produkt und ein Verfahren, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich einen "nicht-kovalent bindenden Inhibitor". Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 83 EPÜ nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 84 EPÜ geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt bzw das Verfahren über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, dass er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Produkte und das Verfahren die als eine Thrombinaktivität inhibierende Substanz Benzamidin oder p-Aminobenzamidin enthalten, z.B. wie in den Ausführungsbeispielen 5 angegeben, oder wie in der Beschreibung auf Seite 13, Tabelle 4 und 5 erläutert.)



Europäisches
Patentamt

**EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT**

Nummer der Anmeldung
EP 01 10 3992

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
X	US 4 696 812 A (SILBERING STEVEN B ET AL) 29. September 1987 (1987-09-29) * Spalte 1, Zeile 22 - Spalte 4, Zeile 13; Ansprüche 1-6; Tabellen I-IV *	1-9, 11-15	
P,X	DE 198 53 033 A (CENTEON PHARMA GMBH) 25. Mai 2000 (2000-05-25) * Seite 2, Zeile 3 - Seite 4, Zeile 6; Ansprüche 1,6,10,15,16 *	1-15	
A	WO 99 37304 A (BURNS CHRISTOPHER J ;CHOI SLEDESKI YONG MI (US); LAU WAN F (US); P) 29. Juli 1999 (1999-07-29) * Ansprüche 48,5062,63,72 *	1-15	
A	WO 99 00356 A (GONG YONG ;KLEIN SCOTT I (US); PAULS HEINZ W (US); GUERTIN KEVIN R) 7. Januar 1999 (1999-01-07) * Ansprüche 58-61; Beispiel 309 *	1-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 01 10 3992

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am 20-07-2001.
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

20-07-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0439156 A	31-07-1991	IE 900266 A	31-07-1991
		AT 140026 T	15-07-1996
		CA 2034826 A	25-07-1991
		DE 69120550 D	08-08-1996
		JP 4211372 A	03-08-1992
		US 5151355 A	29-09-1992
		ZA 9100500 A	27-11-1991
EP 0543178 A	26-05-1993	DE 4137996 A	27-05-1993
		AT 162218 T	15-01-1998
		AU 658238 B	06-04-1995
		AU 2850292 A	20-05-1993
		CA 2083243 A	20-05-1993
		DE 59209133 D	19-02-1998
		DK 543178 T	14-09-1998
		ES 2113910 T	16-05-1998
		GR 3026253 T	29-05-1998
		JP 5194261 A	03-08-1993
		KR 261360 B	01-07-2000
		NO 924453 A	20-05-1993
		US 5723123 A	03-03-1998
EP 0444692 A	04-09-1991	JP 2114459 C	06-12-1996
		JP 3255035 A	13-11-1991
		JP 8013750 B	14-02-1996
		AT 116858 T	15-01-1995
		AU 643753 B	25-11-1993
		AU 7199291 A	05-09-1991
		CA 2037325 A	02-09-1991
		DE 69106549 D	23-02-1995
		DE 69106549 T	22-06-1995
		DK 444692 T	20-03-1995
		ES 2069761 T	16-05-1995
		US 5149540 A	22-09-1992
US 5219328 A	15-06-1993	AT 199833 T	15-04-2001
		AU 641472 B	23-09-1993
		AU 7173391 A	24-07-1991
		CA 2072355 A	04-07-1991
		DE 69132563 D	26-04-2001
		EP 0509041 A	21-10-1992
		ES 2155055 T	01-05-2001
		JP 5504950 T	29-07-1993
		JP 3136157 B	19-02-2001
		KR 197930 B	15-06-1999
		RU 2104701 C	20-02-1998

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 01 10 3992

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

20-07-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5219328 A		WO 9109641 A	11-07-1991
		US 5318524 A	07-06-1994
US 4696812 A	29-09-1987	AT 83927 T	15-01-1993
		AU 586897 B	27-07-1989
		AU 6451786 A	30-04-1987
		CA 1272128 A	31-07-1990
		DE 3687402 A	11-02-1993
		DE 3687402 T	06-05-1993
		DK 512686 A	29-04-1987
		EP 0221700 A	13-05-1987
		ES 2053442 T	01-08-1994
		GR 3006727 T	30-06-1993
		JP 7064747 B	12-07-1995
		JP 62106028 A	16-05-1987
		NZ 217190 A	29-05-1989
		PH 23444 A	07-08-1989
		ZA 8608223 A	29-07-1987
DE 19853033 A	25-05-2000	KEINE	
WO 9937304 A	29-07-1999	AU 2653399 A	09-08-1999
		BG 104633 A	30-03-2001
		BR 9907300 A	24-10-2000
		CN 1291892 T	18-04-2001
		EP 1051176 A	15-11-2000
		NO 20003808 A	26-09-2000
		TR 200002182 T	21-12-2000
WO 9900356 A	07-01-1999	US 6080767 A	27-06-2000
		AU 8177198 A	19-01-1999
		BG 103264 A	31-01-2000
		BR 9806060 A	31-08-1999
		CN 1236358 T	24-11-1999
		EP 0931060 A	28-07-1999
		JP 2001500532 T	16-01-2001
		NO 990854 A	23-04-1999
		PL 331985 A	16-08-1999
		SK 22099 A	09-10-2000
		ZA 9805664 A	13-01-1999

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82